

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

19/37,DE/3 (Item 3 from file: 351)

010234653 WPI Acc No: 95-135910/18

XRAM Acc No: C95-062214

XRPX Acc No: N95-107178

Monoclonal antibody against growth factor receptor, esp. c-erbB-2 - prepared using human cancer cell soluble extract as immunogen, useful for diagnosis and therapy of adenocarcinoma, esp. mastocarcinoma

Index Terms: MONOCLONAL ANTIBODY GROWTH FACTOR RECEPTOR PREPARATION HUMAN CANCER CELL SOLUBLE EXTRACT IMMUNOGENIC USEFUL DIAGNOSE THERAPEUTIC ADENOCARCINOMA MASTOCARCINOMA

Patent Assignee: (KOKU-) KOKURITSU GAN CENT SOCHO; (SAKA) OTSUKA PHARM CO LTD

Number of Patents: 001

Number of Countries: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Week	Applic No	Date	LA	Pages	IPC
JP 7059588	A	950307	9518	JP 91229835	910531		18	@C12P-021/08 @ (B)

Priority Data (CC No Date): JP 91229835 (910531)

Abstract (Basic): JP 07059588 A

Monoclonal antibody to growth factor receptor is prepd. by using soluble substance of human cancer cells as immunogen. Also claimed is the c-erbB-2 monoclonal antibody which reacts specifically with c-erbB-2-related protein and produced by a hybridoma formed by fusion of mammalian bone marrow cells with mammalian immunocyte immunised with culture supernatant liquor of human mastocarcinoma cell strain SK-BR-3.

USE - The antibody reacts specifically with c-erbB-2 related protein and it is useful in diagnostics and as an anti-oncotic for therapy of adenocarcinoma partic. mastocarcinoma (claimed).

Dwg.0/0

Derwent Class: @B04@; @D16@; S03;

Int Pat Class: @A61K-039/395@; @C12N-015/06@; @C12P-021/08@; @G01N-033/574@; @G01N-033/577@; @C12P-021/08@ @C12R-001-91@

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-59588

(43)公開日 平成7年(1995)3月7日

(51)IntCl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		9161-4B		
A 6 1 K 39/395	ADU T			
C 1 2 N 15/06				
G 0 1 N 33/574	A			
33/577	B			

審査請求 未請求 請求項の数5 書面 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-229835

(22)出願日 平成3年(1991)5月31日

特許法第30条第1項適用申請有り 1990年11月、American Association for Cancer Research, Inc発行の「Cell Growth & Differentiation Vol. 1」に発表

(71)出願人 590001452

国立がんセンター総長

東京都中央区築地5丁目1番1号

(71)出願人 000206956

大塚製薬株式会社

東京都千代田区神田司町2丁目9番地

(72)発明者 本田 聡

静岡県浜松市葵町276-955 ローヤル石津201号

(72)発明者 人見 次郎

千葉県浦安市富士見1丁目17番1号 コーポヒロ101号

(74)代理人 弁理士 三枝 英二 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 増殖因子レセプターに対するモノクローナル抗体の製造方法及び抗c-erbB-2モノクローナル抗体

(57)【要約】

【構成】本発明は、ヒト癌細胞の可溶化物を免疫抗原として用いることを特徴とする増殖因子レセプターに対するモノクローナル抗体の製造方法、並びにヒト乳癌細胞株SK-BR-3で免疫した哺乳動物の免疫細胞と哺乳動物の骨髓細胞との融合により形成されたハイブリドーマにより産生されc-erbB-2関連蛋白質に特異的に反応する抗c-erbB-2モノクローナル抗体と該抗体を必須成分として含有する抗腫瘍剤及び癌の診断剤とを提供するものである。

【効果】本発明抗体は、c-erbB-2関連蛋白質に特異的に反応することを特徴としており、腺癌、特に乳癌の診断及び治療に有用である。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒト癌細胞の可溶化物を免疫抗原として用いることを特徴とする増殖因子レセプターに対するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項2】ヒト乳癌細胞株SK-BR-3の培養上清で免疫した哺乳動物の免疫細胞と哺乳動物の骨髓細胞との融合により形成されたハイブリドーマにより産生されc-erbB-2関連蛋白質に特異的に反応することを特徴とする抗c-erbB-2モノクローナル抗体。

【請求項3】ハイブリドーマGFD-OA-p185-1 (微工研菌寄第12206号)である請求項2記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】請求項2に記載の抗体を必須成分として含有することを特徴とする抗腫瘍剤。

【請求項5】請求項2に記載の抗体を必須成分として含有することを特徴とする癌の診断剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、癌の診断及び治療に有用な増殖因子レセプターに対するモノクローナル抗体、
20 代表的にはc-erbB-2関連蛋白質に対するモノクローナル抗体の製造方法及び該モノクローナル抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】癌遺伝子産物は、現在約50種類知られている。その癌遺伝子産物中、もっとも大きなグループを形成するのはチロシンキナーゼであり、これは細胞膜にぶら下がるように存在するsrc型と、細胞膜を貫通し増殖因子との結合部位を有する受容体型に大別される。この受容体型チロシンキナーゼ(チロシン残基特異的蛋白質リン酸化酵素)癌遺伝子は、種々の構造的変化を受けて癌遺伝子として活性化されることが知られている。しかしながら、ヒト悪性腫瘍においては、この構造的変化は認められず、遺伝子増幅と癌遺伝子産物の高発現が検出される場合がしばしば認めれる。特に、受容体型チロシンキナーゼのうち、上皮細胞成長因子(epidermal growth factor, EGF)と該EGFの受容体(レセプター)と酷似する蛋白質をコードする関連遺伝子として見いだされたc-erbB-2遺伝子[Yamamoto, T., et al., Nature, 319, 230-234 (1986)]の癌遺伝子産物であるp185遺伝子は、種々のヒト悪性腫瘍において該遺伝子の増幅と癌遺伝子産物の高発現が認められており、特に腺癌中に高頻度のc-erbB-2遺伝子の増幅が認められている。また、このc-erbB-2遺伝子の増幅程度が、その腺癌、特に乳癌の予後と強い相関を示すことが既に見いだされている[Slamon, D. J., et al., Science, 235, 177-182 (1987)]。

【0003】c-erbB-2遺伝子は、センバラによ

2

りEGFレセプター遺伝子と類似の構造を持つ遺伝子として発見され[Semba, K., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82, 6497-6501 (1985)]、N末端のシグナルペプチドに続く細胞外ドメインには、2ヶ所のシステインに富んだ領域があり、またEGFレセプターとのアミノ酸配列の相同性が44%と高く、同様のレセプターの働きをしていると考えられている。該遺伝子の細胞内ドメインは最初のキナーゼドメインとC末端の制御ドメインとよりなり、前者はアミノ酸配列において、EGFレセプターのキナーゼドメインと82%の高い相同性を示す。後者は相同性こそ32%とやや低いが、C末端近くのキナーゼ活性制御に重要と考えられる3個のチロシン残基が、それぞれEGFに対応する位置に保存されている。また、c-erbB-2遺伝子はワインバーグらの分離したラットの癌遺伝子neu[Bargmann, C. I., et al., Nature, 319, 226-230 (1986)]と相同性が高く、該ラットにおけるneuとヒトにおけるc-erbB-2とは、同じ遺伝子を指しているものと結論された。更に、c-erbB-2は分子量が185kdの大きさの特異的なタンパク質として検出され、アミノ酸の一次構造から予想された分子量140kdよりかなり大きいことから、糖鎖の結合したタンパク質であると推定された[Akiyama, T., et al., Science, 232, 1644-1646 (1986)]。そして、このタンパク質は試験管内において、チロシンに特異的なタンパク質リン酸化酵素活性を示した。

【0004】c-erbB-2の変異と発癌性(トランスフォーム能)については、ラットのneu遺伝子のトランスフォーム活性が、細胞膜通過領域にただ一つの変異が起り、バリンがグルタミン酸に変化したことにより獲得されるものであることが明らかになり[Bargmann, C. I., et al., Cell, 45, 649-657 (1986)]、このことからc-erbB-2においても、対応する659番目のアミノ酸がバリンであることから、これをグルタミン酸に変異させるとneu遺伝子と同様に、NIH3T3細胞に対するトランスフォーム能を獲得すると報告されている[DiFiore, P. P., et al., Science, 237, 178-182 (1987)]。また、C末端の制御ドメインを大幅に欠損させる変異によっても、前記の変異よりは弱いものの、細胞トランスフォーム能を獲得し得る。更に、上記両変異が共存すると、c-erbB-2はより高いトランスフォーム能を獲得することができる。これらのトランスフォーム能を獲得した例では、いずれもc-erbB-2タンパク質のチロシンリン酸化活性が上昇しており[Segatto, O., et al., Mol. Cell. Biol., 8, 5570-5574 (1988)]、c-erbB

3

ー2タンパク質もEGFレセプターと同様に、チロシンリン酸化によって細胞外の増殖シグナルを細胞内に伝えていること、及び変異によって癌遺伝子化することが考えられている。

【0005】いま一つの活性化としては、遺伝子の増幅が考えられる。この点については、SV40プロモーターにつないだc-erbB-2は、NIH3T3をトランスフォームする活性を持たないが、NIH3T3細胞中で導入されたSV40プロモーターつきc-erbB-2遺伝子の増幅を起こし、その発現が上昇するとNIH3T3細胞は、トランスフォームした形質を示すようになる。このことから、c-erbB-2の高い発現は、やはり細胞の異常増殖に役割を果たすと考えられる [Di-Fiore, P. P., et al., Science, 237, 178-182 (1987)]。

【0006】c-erbB-2のヒト癌における遺伝子増幅については、胃癌と乳癌を中心とした腺癌において、しばしば遺伝子増幅の認められることが報告されている [Yokota, J., et al., Lancet I, 765-767 (1985)]。乳癌については、ヒト乳癌と乳癌由来の培養細胞に、c-erbB-2の遺伝子増幅が認められること [King, C. R., et al., Science, 229, 974-976 (1985); Yamamoto, T., et al., Nature, 319, 230-234 (1986)] と、欧米では乳癌は最も頻度の高い癌の一つであることが重なって、現在までに遺伝子増幅と乳癌の悪性度の関係が種々追求されてきている。之等多くの報告を総合すると、乳癌手術組織においてほぼ20%前後の割合で、c-erbB-2遺伝子の増幅が見られ、その多くは予後が悪いが、転移が見られる等、悪性度の高いことが示唆されている [Slamon, D. J., et al., Science, 235, 177-182 (1987); Kraus, M. H., et al., EMBO J., 6, 605-610 (1987); Zbou, D., et al., Cancer Res., 47, 6123-6125 (1987); Vijer, M., et al., Mol. Cell. Biol., 7, 2019-2023 (1987); Guerin, M., et al., Oncogene Res., 3, 21-31 (1988); Ali, I. U., et al., Gene Res., 3, 139-146 (1988); Tal, M., et al., Cancer Res., 48, 1517-1520 (1988)]。本邦においても津田らが手術組織の病理標本から抽出したDNAを用いて、スロット・プロット法でc-erbB-2遺伝子の増幅を検討し、10年間の術後生存率を比較した成績を報告しており、該報告によれば、遺伝子増幅の見られた例では明らかに予後が悪かった [Tsuda, H., et al., Canc

4

er Res., 49, 3104-3108 (1989)]。

【0007】以上のような背景の中で近年では、c-erbB-2タンパク質に対する抗体やモノクローナル抗体も開発され、病理材料のみならず、手術材料を直ちに免疫染色法によって検査する方法も開発されつつあり [Masuko, T., et al., Jpn. J. Cancer Res., 80, 10-14 (1989); Yamada, Y., et al., Jpn. J. Cancer Res., 80, 1192-1198 (1989)]、c-erbB-2癌遺伝子産物を認識する抗体としても、例えばc-erbB-2遺伝子のC末端領域を認識するポリクローナル抗体、pAb1 (T4881) [トリトンバイオサイエンス社製 (Triton Bioscience Inc.; Alameda, CA)] や、キナーゼドメインを認識するポリクローナル抗体Ab-1 [オンコジーンサイエンス社製 (Oncogene Science Inc.; Manhasset, NY)] や、c-erbB-2の細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体、SV2-61r [ニチレイ株式会社製 (Nitirai Co.; Tokyo, Japan)] 等が知られている。

【0008】

【発明が解決しようとする問題点】本発明の目的は、腺癌、特に乳癌の診断と治療において、これと関連の深い増殖因子レセプター（ある種の癌遺伝子）を認識するモノクローナル抗体及びその製造方法を提供することにある。

【0009】本発明はまた、ヒト乳癌細胞株SK-BR-3の培養上清で免疫した哺乳動物の免疫細胞と哺乳動物の骨髓細胞との融合により形成されたハイブリドーマにより産生され、c-erbB-2関連蛋白質に特異的に反応する抗c-erbB-2モノクローナル抗体を提供することを目的とする。

【0010】更に本発明は腺癌、特に乳癌の診断剤及び治療剤を提供することをも目的としている。

【0011】本発明者らは、上記目的から鋭意研究を重ねた結果、ヒト癌細胞の可溶化物を免疫抗原として用いる場合には、目的とする増殖因子レセプターを認識するモノクローナル抗体が製造できることを見出すと共に、ヒト乳癌細胞株であるSK-BR-3細胞から上記方法に従って抗c-erbB-2モノクローナル抗体を得るに成功し、ここに本発明を完成するに至った。

【0012】

【問題を解決するための手段】本発明によれば、ヒト癌細胞の可溶化物を免疫抗原として用いることを特徴とする増殖因子レセプターに対するモノクローナル抗体の製造方法、及びヒト乳癌細胞株SK-BR-3で免疫した哺乳動物の免疫細胞と哺乳動物の骨髓細胞との融合により形成されたハイブリドーマにより産生されc-erb

5

B-2 関連蛋白質に特異的に反応することを特徴とする抗c-erbB-2モノクローナル抗体が提供される。

【0013】また本発明によれば、ハイブリドーマがGFD-OA-p185-1（微工研菌寄第12206号）である上記抗c-erbB-2モノクローナル抗体が提供される。

【0014】本発明抗体は、c-erbB-2関連蛋白質に特異的に反応することを特徴としており、この抗体の利用によれば、悪性腫瘍等の臨床治療及び診断を有効に行なうことができる。従って、本発明はかかる悪性腫瘍等の臨床治療剤及び診断剤をも提供するものである。

【0015】以下、本発明のモノクローナル抗体の製造方法につき詳述する。

【0016】本発明抗体の製造は、上記の通りヒト癌細胞の可溶化物を免疫抗原として用いることを必須の要件として、その他は一般的モノクローナル抗体の製造方法と同様にして実施でき、これによって増殖因子レセプターに対する所望抗体を容易に収得できる。ここで上記増殖因子レセプターには、例えば上皮成長因子レセプター（epidermal growth factor receptor; EGFR）、インスリン様成長因子レセプター（IGFR）、血小板由来成長因子レセプター（platelet-derived growth factor receptor）、コロニー刺激因子レセプター（CSFR）等が包含される。

【0017】本発明抗c-erbB-2モノクローナル抗体を例にとり、上記製造方法を詳述すれば、これは例えば特定の融合細胞から産生される。該融合細胞を得るための一方の親細胞（免疫細胞）としては、ヒト乳癌細胞株SK-BR-3細胞の可溶化物が用いられる。該免疫細胞は、SK-BR-3細胞より通常の方法に従い、例えば培養上清濃縮物等の形態に可溶化して調製できる。ここで用いられるSK-BR-3細胞は公知であり、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）に寄託されている[Havel, R. J., et al., J. Clin. Invest., 34, 1345-1353 (1955) 等参照]。

【0018】上記SK-BR-3細胞の可溶化物を免疫抗原として利用した本発明抗体の製造も、常法に従って実施することができる[例えばHanfland, P., Chem. Phys. Lipids, 15, 105 (1975); Hanfland, P., Chem. Phys. Lipids, 10, 201 (1976); Koscielak, J., Eur. J. Biochem., 37, 214 (1978) 等参照]。

【0019】該方法は、より具体的には、例えば上記免疫抗原で免疫した哺乳動物の形質細胞（免疫細胞）と哺乳動物の形質細胞腫細胞（骨髄細胞）との融合細胞（hybridoma）を作成し、これよりc-erbB-2関連蛋白質を認識する所望抗体を生産するクーロンを

6

選択し、該クーロンの培養により実施できる。本発明抗体としては、粗製抗体液、即ち抗体産生ハイブリドーマの培養上清あるいはマウス腹水の状態のものをそのまま利用でき、また、常法に従って例えば硫酸アンモニウム分画やイオン交換クロマトグラフィーあるいはプロテインA抗原カラム等によるアフィニティクロマトグラフィーにより精製した精製抗体として利用することも可能である。

【0020】上記融合細胞の製造において免疫抗原、即ち、SK-BR-3細胞の可溶化物で免疫される哺乳動物としては、特に制限はないが、細胞融合に使用する形質細胞腫細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般にはマウス、ラット等が有利に用いられる。免疫は一般的方法により、例えば上記免疫抗原又は必要に応じて適当な結合試薬により担体と結合させた抗原を、哺乳動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内注射等により投与することにより実施できる。

【0021】上記において用いられる担体としては、通常抗原の作成に当り慣用されている高分子の天然もしくは合成の蛋白質を広く使用できる。該担体には例えば各種動物の血清アルブミン類、血清グロブリン類、チログロブリン類、ヘモグロブリン類、ヘモシアニン類や回虫より抽出された蛋白質（アスカリス抽出物、特公昭61-61350号公報）等のほか、ポリリジン、ポリグルタミン酸、リジン-グルタミン酸共重合体、リジン又はオルニチンを含む共重合体等が包含される。

【0022】また結合試薬としては、通常の抗原の作成に当り慣用されているものを広く使用できる。具体的にはアミノ基とアミノ基を架橋結合させる、例えばグリオキサール、マロンジアルデヒド、グルタルアルデヒド、スクシナルデヒド、アジポアルデヒド等の脂肪族ジアルデヒド類；チオール基とチオール基とを架橋結合させる、例えばN, N'-o-フェニレンジマレイミド、N, N'-m-フェニレンジマレイミド等のジマレイミド化合物、アミノ基とチオール基とを架橋結合させる、例えばメタマレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシニイミドエステル等のマレイミドカルボキシル-N-ヒドロキシスクシニイミドエステル類、アミノ基とカルボキシル基とをアミド結合させる通常のペプチド結合形成反応に用いられる試薬、例えばN, N-ジシクロヘキシルカルボジイミド、N-エチル-N'-ジメチルアミノカルボジイミド、1-エチル-3-ジイソプロピルアミノカルボヒドロキシスクシニイミドエステル化合物、アミノ基とカルボキシ基とをアミド結合させる通常のジイミド類等の脱水縮合剤等を挙げることができる。更にp-ジアゾニウムフェニル酢酸等のジアゾニウムアリアルカルボン酸類と通常のペプチド結合形成反応試薬、例えば上記脱水縮合剤とを組合せたものも、上記結合試薬として使用可能である。

【0023】免疫は、例えばマウスを例にとり詳述すれ

7

ば、上記免疫抗原を生理食塩水含有リン酸緩衝液 (PBS) や生理食塩水等で適当な濃度に希釈し、所望により通常のアジュバントと併用して、供試動物に2~14日毎に数回投与し、総投与量が約100~500 μ g/マウス程度になるようにして実施するのが好ましい。免疫細胞としては、上記最終投与の約3日後に摘出した脾臓細胞を使用するのが好ましい。ここで免疫抗原として使用される細胞は、例えば牛胎児血清 (FCS) 等を含む通常の培養用培地、具体的には5% FCS添加RPMI-1640培地等にて培養後、10~100倍に濃縮した培養細胞として有利に使用できる。アジュバントとしては、例えば百日咳ワクチン、完全フロインドアジュバントあるいはアラムを用いるのが適当である。

【0024】上記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物の形質細胞腫細胞としては、既に公知の種々のもの、例えばp3/ \times 63-Ag8 (X63)

[Nature, 256, 495-497 (1975)], p3/X63-Ag8, U1 (P3U1) [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)], P3/NSI-1-Ag4-1 (NS-1) [Eur. J. Immunol., 6, 511-519 (1976)], Sp2/0-Ag14 (Sp2/0) [Nature, 276, 269-270 (1978)], FO [J. Immunol. Meth., 35, 1-21 (1980)] 等やラットにおける210. RY3, Ag1. 2. 3. (Y3) [Nature, 277, 131 (1979)] 等の骨髓腫細胞等を使用できる。

【0025】上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との融合反応は、公知の方法、例えばマイルスタインら (Milstein) の方法 [Method in Enzymology, 73, 3 (1981)] 等に準じて行なうことができる。より具体的には上記融合反応は、通常の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等の存在下に、通常の培地中で実施され、培地には更に融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加することもできる。また、電気処理 (電気融合) による方法等を適宜採用することもできる。免疫細胞と形質細胞腫細胞との使用比は、通常の方法と変わりなく、例えば形質細胞腫細胞に対して免疫細胞を約1~10倍程度用いるのが普通である。融合反応時の培地としては、形質細胞腫細胞の増殖に通常使用される各種のもの、例えばRPMI-1640培地、MEM培地、その他この種細胞培養に一般に利用されるものを例示でき、通常これら培地は牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を抜いておくのがよい。融合は上記免疫細胞と形質細胞腫細胞との所定量を、上記培地内でよく混合し、予め37 $^{\circ}$ C程度に加温したPEG溶液、例えば平均分子量1000~6000

8

程度のものを、通常培地に約30~60w/v%の濃度で加えて混ぜ合わせるにより行なわれる。以後、適当な培地を逐次添加して遠心し、上清を除去する操作を繰り返すことにより、所望のハイブリドーマが形成される。

【0026】得られる所望のハイブリドーマの分離は、通常の選別培地、例えばHAT培地 (ヒポキサンチン、アミノプリン及びチミジンを含む培地) で培養することにより行なわれる。該HAT培地での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (未融合細胞等) が死滅するのに十分な時間、通常数日~数週間程度行なえばよい。かくして得られるハイブリドーマは、通常の限界希釈法等により目的とする抗体の検索及び単一クローン化に供される。

【0027】目的抗体産生株の検索は、例えばELISA法 [Engvall, E., Meth. Enzymol., 70, 419-439 (1980)], プラーク法、スポット法、凝集反応法、オクタロニー (Ouchterlony) 法、ラジオイムノアッセイ (RIA) 法等の一般に抗体の検出に用いられている種々の方法 (「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30-53頁、昭和57年3月5日参照) に従い実施することができ、この検索には前記免疫抗原が利用できる。

【0028】かくして得られるc-erbB-2関連蛋白質を認識する所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することができ、また液体窒素中で長期保存することができる。上記ハイブリドーマからの本発明モノクローナル抗体の採取は、該ハイブリドーマを、常法に従って培養してその培養上清として得る方法や、ハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。また上記のごとくして得られる抗体は、更に塩析、ゲル濾過法、アフィニティクロマトグラフィー等の通常の手段により精製することができる。

【0029】本発明抗体は、これを利用して、例えば免疫沈降法、アフィニティクロマトグラフィー等の通常の手段により、c-erbB-2関連蛋白質を簡便且つ特異的に精製することが可能である。

【0030】また、本発明抗体の利用によれば、検体中のc-erbB-2関連蛋白質を、免疫反応により特異的に測定することができる。該方法としては、通常の競合法、サンドイッチ法によるラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素免疫測定法 (ELISA)、免疫沈降法、凝集法等の免疫学的手法が挙げられ、これら各方法の操作、手順等は、常法に変わるところはない。より具体的には、例えば免疫沈降法を採用する場合、プロテインA-セファロース等の担体に本発明抗体を結合させるか、

或るいはウサギ抗マウスIgG抗体などの標識抗体を第2抗体として予め担体と結合させた後、この結合物に本発明抗体を反応させるか、又は上記第2抗体を直接カップルさせた担体に本発明抗体を反応させる。次いで、測定する検体、例えば可溶化した細胞を ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I などで標識した後、これを本発明抗体と反応させ、遠心分離後、反応沈殿物をレムリ(Laemmli)などの緩衝液に懸濁させた後、この反応懸濁液を例えば、 110°C 等の高温で反応させ、ポリアクリルアミドゲルを使ったSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行なうことにより、本発明の抗体と特異的に反応するc-erbB-2関連蛋白質の特異的バンドが検出できる。

【0031】上記検定法において検体としては、体液、例えば血液、細胞組織液等を使用でき、これらのうちでは血液、特に血清又は血漿が好ましい。更に常法に従い、細胞を可溶化細胞分解物に分画したものも上記検体として使用することができる。ここで可溶化した細胞、或るいは可溶化細胞分解物を標識する代わりに、本発明抗体を標識することもできる。

【0032】本発明抗体の標識物質としては、グルコアミラーゼ、パーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ等の各種の酵素や、 ^{32}P 、 ^{35}S システイン、 ^{125}I 、 ^{131}I 、トリチウム等の放射性物質等が挙げられる。該標識化は、常法に従えばよい[Nature, 194, 495 (1962); Acta. Endocrinol. Suppl., 168, 206 (1972)]。

【0033】不溶化抗体は、細胞分解産物又は本発明抗体を、不溶性担体に化学的又は物理的に結合させることにより製造される。不溶性担体としては、セルロース粉末、セファデックス、セファロース、ポリスチレン、濾紙、カルボキシメチルセルロース、イオン交換樹脂、デキストラン、プラスチックフィルム、プラスチックチューブ、ナイロン、ガラスビーズ、絹、ポリアミン-メチルビニルエーテル-マレイン酸共重合体、アミノ酸共重合体、エチレン-マレイン酸共重合体等が挙げられる。不溶化は、共有結合法としてのジアゾ法、ペプチド法、アルキル化法、架橋試薬による担体結合法(架橋試薬としてグルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアナート等を用いる)、Ug1反応による担体結合法等の化学反応;あるいはイオン交換樹脂のような担体を用いるイオン結合法;ガラスビーズ等の多孔性ガラスを担体として用いる物理的吸着法等によって行なわれる。上記測定法において反応(免疫反応)は、通常 45°C 程度以下、好ましくは $4\sim 40^\circ\text{C}$ 程度の温度で、数時間 ~ 24 時間程度で行なわれる。

【0034】かくして、本発明抗体を用いれば、簡便に、高精度に、検体中のc-erbB-2関連蛋白質を測定することができる。

【0035】かかる本発明抗体を利用した精製系並びに測定系の設定、改変ないし応用は、当業者にとり自明である。

【0036】本発明抗体のヒト癌細胞株に対する細胞障害試験によれば、本発明抗体はSK-RB-3細胞やA-431細胞に対する細胞障害作用を有することが観察され、このことより本発明抗体は標的細胞障害能を有することが確認された。従って、本発明抗体は抗腫瘍剤として有効であり、本発明によればヒト及びその他の哺乳動物に対する抗腫瘍剤をも提供することができる。

【0037】本発明抗腫瘍剤は、上記モノクローナル抗体をその必須成分として含有することを基本として、他は通常の製剤技術乃至この種モノクローナル抗体を用いる免疫療法等で慣用される技術手段に従い調製することができる。より詳しくは、本発明抗腫瘍剤は、本発明抗体と共に適当な無毒性医薬製剤担体を配合して常法に従い製剤組成物の形態に調整される。ここで用いられる担体としては、調製される製剤の使用形態に応じて、通常慣用される各種のもの、例えば充填剤、増量剤、結合剤、表面活性剤、緩衝液、安定化剤等の賦形剤乃至希釈剤のいずれをも使用できる。調製される製剤形態としては、これが治療剤有効成分の有効量を効果的に含有する状態であればよく、例えば錠剤、粉末剤等の固剤であってもよいが、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の注射剤形態とするのがよい。また該製剤形態としては使用前に適当な担体の添加により液状となし得る乾燥品の形態をも採用できる。上記いずれの形態も常法に従い調製できる。また各形態の製剤は、その形態に応じて適当な投与経路、例えば注射剤形態の製剤では静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内投与され、固剤形態の製剤は経口乃至経腸投与される。

【0038】本発明治療剤の投与量は該製剤の投与方法、投与形態、使用目的、適応患者等に応じて適宜決定され一定でないが、一般には有効成分とする本発明抗体の量が約0.00001 \sim 80重量%程度含有されるものとするのがよく、この製剤は一日成人一人当たり約0.01 $\mu\text{g}\sim 10\text{mg}$ 程度の範囲で適用されるのが好ましい。かくして本発明治療剤の投与によれば、これらを投与された患者の体内において腫瘍組織での細胞傷害性が増強され、かくして所望の治療効果が奏される。

【0039】

【発明の効果】本発明によれば、増殖因子レセプターに対するモノクローナル抗体の製造方法、並びに抗c-erbB-2モノクローナル抗体及び該抗体を利用した乳癌の診断剤及び治療剤が提供される。

【0040】

【実施例】以下、本発明を更に詳しく説明するため実施例を挙げるが、本発明は之等に限定されない。

【0041】

50 【実施例1】

① 免疫処置のための細胞の調整

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) より入手したヒト乳癌細胞株 SK-BR-3 (寄託番号 ATCC HTB30) を、5% 熱不活性 FCS (ペーリンガー・マンハイム社製) とペニシリン (100 単位/ml) 及びストレプトマイシン (200 mg/ml) とを加えた RPMI-1640 培地 (日本製薬社製) で、225 cm² プラスチック組織培養フラスコ (スミロン、住友パークライト社製) で、37℃ 下、5% CO₂ 条件下に培養した。

【0042】上記細胞が細胞塊に成長した時、血清フリーの培養液で洗い、その後、同培養液 50 ml に加えた。37℃ で 72 時間インキュベートした後、培養液を無菌下で集め、細胞の断片を除いた後、得られた血清フリーの培地 200 ml を全部ダイアフロー YM-10 膜 (商品名: M、カットオフ値 1000: アミコン社製) を装着したダイアフロー・セル・タイプ 8200 (アミコンコーポ社製) を用いて、窒素ガスにて加圧して、培養上清を 20 倍と 80 倍とに濃縮した。濃縮物を、0.22 μm ミリポアフィルターで濾過し、-80℃ で凍結

【0043】② 抗体産生ハイブリドーマの製造と一次スクリーニング

上記①で調整した SK-BR-3 細胞の 20 倍濃縮培養液 100 μl を、同量のフロインド完全アジュバンドと共に、雄の Balb/c 系マウス (6 週齢、日本チャールズ・リバー社製より入手) の腹腔内に投与して免疫した。その後、同液の同量を 2 回、3 週間おきに同様に追加投与し、最終投与の 7 日後に更に SK-BR-3 細胞の 80 倍濃縮培養液 200 μl を同様に追加投与して免疫した。

【0044】最終免疫の 3 日後に、免疫したマウスより脾臓を摘出し、摘出脾臓より脾細胞を集め、これを用いてマイルスタインらの方法 [Milstein, C. et al., Nature, 256, 495-497 (1975)] を改良した方法によって細胞融合を以下の通り実施した。即ち、まず上記脾細胞を 37℃ に加温した RPMI-1640 培地で 3 回洗浄し、同様に他方の親株とするマウス骨髓腫細胞 P3/x63-Ag8U1 [Yelton, D. E., et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 81, 1-7 (1978)] も洗浄した。尚、このマウス骨髓腫細胞は、10% 熱不活性化牛血清 (CBS: ハイクロン・ラボラトリーズ社製) を加えた RPMI-1640 培地中で 100 mm 組織培養皿 (コーニング社製) 上で 37℃ 下、5% CO₂ 下で培養して用いた。上記脾細胞と骨髓腫細胞とを細胞数比 10:1 になるように 50 ml のチューブ内で混和し、得られた細胞混合物を 200 × g で 5 分間遠心後、上清をバスツールピペットで完全に除去した。之等の操作は 37℃ に保温した水

槽内にて行なった。

【0045】次にポリエチレングリコール 4000 (メルク社製、以下「PEG」と略称する) 2 ml を加えて、ゆっくりと 1~2 分間かき混ぜ、1 分間放置し、次いで 37℃ に保温した牛胎児血清 (FCS) を含まない RPMI-1640 培地 1 ml をゆっくりと 1 分間位かけて加え、1 分間放置し、更に同液 2 ml を加えて 2 分間放置し、更に同液 4 ml を加えて 4 分間放置した。次いで、37℃ に保温した 15% FCS、200 mg/ml 1 硫酸ストレプトマイシン、100 U/1 ペニシリン、54 mg/1 ゲンタマイシン及び 1 ml ビルベートを含有する RPMI-1640 (以下これを完全 RPMI-1640 培地という) 8 ml を 2~3 分間かけて加えた後、200 × g で 5 分間遠心分離した。上清を吸引除去し、37℃ に保温した完全 RPMI-1640 培地液に、脾細胞 1 × 10⁶ 個/ml となるように懸濁させた。次に、この懸濁液を 96 ウェルプレート (コースター社製) の各ウェルに 0.1 ml ずつ分注し、37℃、5% CO₂、100% 湿度のインキュベーター内で培養した。24 時間後、5 mM ヒポキサンチン、20 μl アミノプテリン及び 800 μl チミジン (フロー・ラボラトリーズ社製) を含む 10% FCS 添加完全 RPMI-1640 培地 (以下これを「HAT 培地」という) の 0.1 ml ずつを各ウェルに添加した。以後、上清を 2 日目及び 3 日目にそれぞれ 0.1 ml ずつ吸引し、新しい HAT 培地 0.1 ml ずつを加えて液交換した。その後、上記液交換を 2~3 日おきに行なった。2 週間目に同様に上清を吸引し、5 mM ヒポキサンチン及び 800 μl チミジンを含む完全 RPMI-1640 培地 (以下これを「HT 培地」という) に代えた。以後、完全 RPMI-1640 培地で増殖維持した。

【0046】上記操作による細胞融合後、10~14 日間でコロニーが肉眼で観察されるようになった。細胞が 96 ウェルプレートの底面積の 1/4 を占めた時より、免疫抗原として用いた SK-BR-3 細胞の膜抗原を抗原として、酵素免疫法 (ELISA 法) にて、培養上清を試験し、陽性となったウェルから直ちに限界希釈法 (Method in Enzymology, 73, 3 (1981)) により、ハイブリドーマのクローニングを行なった。尚、上記において抗原として用いた SK-BR-3 細胞の膜分画は以下のようにして調製した。即ち、5% FCS 添加 RPMI-1640 培地で SK-BR-3 細胞を培養後、塊った SK-BR-3 細胞をリン酸緩衝液 (pH 7.3) [10 mM リン酸及び 15 mM NaCl] で洗浄し、4℃ で 400 × g で遠心分離し、集めた細胞を低張緩衝液 (pH 7.4) [20 mM 1, 4-ピペラジンジエタン硫酸-NaOH、1 mM MgCl₂ 及び 5 mM KCl] 中で均一化 (20 ストローク) した。細胞のホモジネートは最初 4℃ で 1500 × g で 5 分間遠心分離し、細胞のペレットをスクリ

ーニングのための膜面分とした。

【0047】上記で調製したSK-BR-3細胞の粗製膜分画(1×10⁶個)を50μlトリス緩衝液(pH 7.5) [20mMトリス塩基及び500mM NaCl、以下「TBS」という]に溶解し、96ウェルマイクロプレートに各ウェルに播き、4℃で8時間インキュベートすることによりコート(被覆)した。次いで上記各ウェルを0.05%ツィーン20を含むTBSで3回洗浄した。更に、飽和の非特異的蛋白結合部位に対して20℃で1時間、TBS中に300μl/ウェルの0.1% (W/v) BSA (コーンのフラクションV:第1純薬社製) でインキュベートした。続いて、0.05% ツィーン20を含むTBSで3回洗浄し、ハイブリドーマ上清50μl/mlずつを各ウェルに加えた。20℃で1時間放置後、ウェルを洗浄し、3000倍に希釈した50μlのアルカリフォスファターゼにカップリングさせたヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体(ハイオ・ラッド社製)を各ウェルに加えた。プレートを20℃で1時間インキュベートした後、未結合の接合体を除くために洗浄した。

【0048】その後、5mgのp-ニトロフェニルリン酸(パイオ・ラッド社製)を含む酵素-基質液の50μl/ウェルを加え、発色反応を0.5M NaOHの50μl/ウェルを加えることにより停止させた。吸光度をイムノリーダーNJ2000(インターメッド社製)で測定した。

【0049】かくして、774ウェルより、反応特異性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ17株を得た。これらはそれぞれ「GFD-OA-p185-1」～「GFD-OA-p185-17」と命名された。

③ 免疫沈降のための抗原の標識

上記②で得た各陽性クローンにつき、之等がリン酸化されたc-erbB-2遺伝子産物を免疫沈降させる活性を保有するか否か、を指標とする二次スクリーニングの実施のための免疫抗原を、以下の通り作成した。

【0050】即ち、まずSK-BR-3細胞の細胞溶解質と培養液を³²Pで標識した。該標識は、カスガらの方法[Kasuga, G., et al., Methods Enzymol., 109, 609-621 (1985)]に従って、まずSK-BR-3細胞の1×10⁷個/100mm皿の集密度細胞をリン酸フリークレブリン緩衝液(pH7.4) [119mM NaCl, 5mM KCl, 1.3mM CaCl₂, 1.2mM MgSO₄, 25mM NaHCO₃, 50mM

Hepes (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸、シグマケミカル社製) 及び0.1% (w/v) BSA] で洗浄した。次に、上記集密度細胞を³²Pi (18.5MBq/ml、ニューイングランド・ヌクレア社製) を用いて、37℃で2時

間、上記と同じ緩衝液2ml中で標識した。細胞を50mM Hepesを含む溶解緩衝液 [10mMピロリン酸ナトリウム(和光純薬社製)、100mMフッ化ナトリウム(関東化学社製)、4mM EDTA、2mM PMSF (フェニルメチルスルホニルフルオリド、シグマケミカル社製)、1%トリトンX-100及び400μMオルトバナジン酸ナトリウム] (pH7.4) で4℃にて1時間可溶化させた。不溶物を12000×gで10分間遠心分離して除去し、得られた細胞分解産物の200μlをc-erbB-2遺伝子産物に特異的に反応するモノクローナル抗体の二次スクリーニング用免疫抗原とした。

【0051】④ 免疫沈降と電気泳動

上記③で得た免疫抗原200μlと一次スクリーニングで得られた陽性クローン10μlとを混合し、4℃で3時間インキュベートした。更に、これにプロテインAセファロース(ファルマシア社製)20μlを加え、4℃、3時間インキュベートした。反応溶液を12000×gで10分間遠心分離し、その沈降物を洗浄用緩衝液(pH7.4) [50mM Hepes, 10mMピロリン酸ナトリウム、100mMフッ化ナトリウム、4mM EDTA、2mM PMSF, 0.05%トリトンX-100及び400μMオルトバナジン酸ナトリウム] にて3回洗浄した。遠心分離の後、沈降物を50μlのラミエールの緩衝液に懸濁させ、110℃で5分間インキュベートした。そして上記懸濁液をレムリの方法[Laemmli, U. K., Nature, 227, 680-685 (1970)]に従って、7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにより分析した。尚、上記SDS-PAGEに使用したSDSは和光純薬社製であり、使用した分子量マーカーはミオシン(分子量200000)、大腸菌β-ガラクトシダーゼ(分子量116250)、ホスホリラーゼ(分子量97400)、BSA(分子量66200)及び卵アルブミン(分子量42699)で、全てパイオ・ラッド社製である。

⑤ 免疫沈降したハイブリドーマのクローニングと抗体の製造及び精製

免疫沈降したハイブリドーマのクローニングは、96ウェルプレートに細胞を0.3個/ウェルになるように希釈した限界希釈法によって行なった。また、クローニングの効率を上げるために、前もってラットの胸腺細胞を2×10⁶個/ウェルとなるように加えた。

【0052】上記操作の結果、3倍希釈した希釈液を更に培養し、350μlの培養液を集めて更に精製した。17のハイブリドーマの中から上記したようにして得られたハイブリドーマはGFD-OA-p185-1と命名したものであった。

【0053】該ハイブリドーマの精製は次の通り行なった。即ち、50% (w/v) 飽和の硫酸アンモニウムの

添加により沈殿させ、140mMリン酸緩衝液(pH 8.0)中に再溶解させ、溶解液の一定量をアフィニティゲルプロテインAアガロースカラムに加え、4℃で140mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0)中で平衡化させ、同緩衝液でカラムを洗浄後、結合した抗体を100mMクエン酸ナトリウム(pH 3.0)で製品使用書に従って溶出させ、溶出液を貯えて中性pHに調整し、-20℃で保管した。

【0054】上記で得られた本発明抗体産生ハイブリドーマGFD-OA-p185-1は、工業技術院微生物工業技術研究所に「GFD-OA-p185-1」なる表示で寄託されており、その寄託番号は「微工研菌寄第12206号(FERM P-12206)」である。

【0055】⑥ モノクローナル抗体培養上清の採取
上記ハイブリドーマGFD-OA-p185-1を完全RPMI-1640培地にて、5%CO₂条件下で、37℃にて96時間培養し、培養液を3000rpm、10分間遠心分離して、目的のモノクローナル抗体を含む培養上清を採取した。

【0056】⑦ 精製抗体の製造
上記⑥で得られたハイブリドーマGFD-OA-p185-1の1×10⁶個を、予めプリスタン(アルドリッチ社製)を接種しておいたBalb/c系マウスに腹腔内投与した。10~14日後、蓄積した腹水を採取し、本発明抗体を含む腹水を得た。

【0057】該腹水中の抗体を、抗体精製キット(MOPS kit;、パイオ・ラッド社製)を用いて精製して、精製抗体GFD-OA-p185-1を得た。

【0058】以下、上記で得られた本発明抗体の特性を実施例2として示す。

【0059】

【実施例2】

① 抗体のサブクラス

マウスモノクローナル抗体サブクラス同定用キット(パイオ・ラッド社製)を用いて決定した上記本発明モノクローナル抗体のサブクラスは、IgG₁であった。

【0060】② 抗体産生レベル

実施例1の⑥で得た培養上清を遠心分離し、上清を10%FCS添加RPMI-1640培地にて、37℃下、5%CO₂の条件下に10日間インビトロにて培養した。

【0061】③ 抗体の力価

精製したc-erbB-2遺伝子産物関連蛋白の50μg/ウェルを予めコート(4℃、24時間)した96ウェルポリスチレンマイクロプレートに、1%BSAの0.01Mリン酸塩緩衝液(pH 7.2)で、4℃下に24時間、ブロックした。その後、実施例1の⑥で得た本発明抗体を含む培養上清を加え、室温で3時間反応させた。上記緩衝液で3回洗浄後、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体(パイオ・ラッド社

製)を用いて、c-erbB-2遺伝子産物関連蛋白に結合した抗体を測定した。培養上清の8×10⁴倍希釈で十分な発色を示した。

【0062】

【参考例1】SK-BR-3細胞株のノーザンブロット分析

c-erbB-2遺伝子は、EGFR遺伝子との相同性がアミノ酸配列で約50%と高いことから、EGFRを過剰に発現するヒト癌細胞株であるA-431細胞を対照にして、SK-BR-3細胞がc-erbB-2遺伝子を発現するかどうかを、既知のc-erbB-2mRNA蛋白の細胞外、膜通過及び細胞質ドメインをそれぞれ認識する合成プローブを用いたノーザンブロット分析により試験した。

【0063】この試験においては、ヒト上皮癌細胞株A-431(ATCC CRL1555, Fabricant, R. N., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 74, 565-569 (1977))を用いた。

【0064】SK-BR-3細胞とA-431細胞を、実施例1の①の方法に従って培養した。ポリアデニルRNAの抽出におけるゲル電気泳動とノーザンブロット分析は、スズキらの方法[Suzuki, M., et al., Jpn. J. Clin. Oncol., 17, 157-163 (1987)]に従って実施した。

【0065】次に配列番号:1~配列番号:5に示した5つの合成オリゴヌクレオチドプローブを、自動DNA合成装置(アプライド・バイオシステムズ社製)を用いて、4種の塩基のβ-シアノエチルホスホアミダイト誘導体より、固相法に従って合成した。合成された各オリゴヌクレオチドをHPLCで精製して、目的プローブとした。

【0066】配列番号:1に示すオリゴヌクレオチドプローブをプローブ1とし、以下各プローブに配列番号と同符号を付して、それらの認識部位を示せば、プローブ1、プローブ2及びプローブ3は、c-erbB-2遺伝子産物の細胞外ドメイン(2-21、34-52と254-273)の配列をコードするmRNAを認識する。プローブ4は、蛋白の膜通過ドメイン(654-675)の配列をコードするmRNAを認識する。またプローブ5は、蛋白の細胞質ドメイン(1055-1074)の配列をコードするmRNAを認識する。

【0067】ヒトβ-アクチンmRNAの発現は、ホンダらの方法[Honda, S., et al., Jpn. J. Cancer Res., 79, 667-681 (1988)]に従って行なった。また、分子量マーカーとして牛肝臓からのリボソームRNA(28Sと18S、ファルマシア社製)を用いた。

【0068】SK-BR-3細胞において、細胞外ドメインに一致するc-erbB-2mRNAの蛋白にハイ

ブリダイズするために3つのプローブを使用した時、5.0 kbpと2.0 kbpの分子サイズをもつ2つのバンドが検出された。前者の発現の強度は、後者の発現の強度より強かった。膜通過ドメインに一致するc-erbB-2 mRNAの蛋白にハイブリダイズするプローブでは、ただ一つ5.0 kbpの分子量サイズでバンドが検出された。A-431細胞においては、前記条件では検出できなかった。β-アクチンmRNAのためにプローブを使用した時は、β-アクチンmRNAに一致するバンドが検出された。加えて、細胞外ドメインに一致するc-erbB-2 mRNAの蛋白にハイブリダイズするプローブの時は、プローブ1とプローブ2と類似の結果が得られた。逆に、プローブ5のケースにおいては、細胞質ドメインに一致するc-erbB-2 mRNAの蛋白にハイブリダイズするものは、5.0 kbpの分子サイズをもつ一つのバンドのみが検出された。上記結果より、SK-BR-3細胞は、明らかにc-erbB-2 mRNA蛋白を発現するものであることが判る。

【0069】

【実施例3】各種抗体を用いた免疫沈降試験

本発明モノクローナル抗体の特徴を明らかにするためにc-erbB-2蛋白やEGF蛋白を認識するポリクローナル抗体やモノクローナル抗体を用いた免疫沈降試験を、以下の通り行なった。

【0070】抗体としては、c-erbB-2遺伝子産物のC末端部分(C末端14アミノ酸配列:1242-1255)を認識するウサギポリクローナル抗体としてpAb1(T4881)(トリトン・バイオサイエンス社製)を、c-erbB-2遺伝子産物蛋白のキナーゼドメイン(アミノ酸配列:866-880)を認識するウサギポリクローナル抗体としてAb-1(オンコジーン・サイエンス社製)を、またc-erbB-2遺伝子産物蛋白の細胞外ドメインを認識するマウスモノクローナル抗体としてSV2-61r(ニチレイ社製)を、それぞれ使用した。この抗体はIgG₁のサブクラスを有するものであり、マスコラの方法[Masuko, T., et al., Jpn. J. Cancer Res., 80, 10-14 (1989)]により作成されたものである。また、EGFRの細胞外ドメインの抗原決定基[Green, M. R., et al., J. Invest. Dermatol., 85, 239-245 (1985)]を認識する抗EGFRモノクローナル抗体として、RPN513(アマシャム社製)を使用した。この抗体は免疫原としてA-431細胞をトリプシン処理したもので作成されており、IgG_{2a}の特徴を有するものである。上記各抗体はいずれも商品取扱書に従って使用した。

【0071】免疫沈降のための免疫抗原の作成と標識を次の通り実施した。即ち、実施例1の③と同様の方法でSK-BR-3細胞とA-431細胞の細胞分解物中の

蛋白を³²Pで標識した。

【0072】② ポリクローナル抗体の調整及び各種抗体との免疫沈降反応

実施例1の①と同様の方法で免疫処置のためのSK-BR-3細胞と、A-431細胞とを、培地で調整した後、ポリクローナル抗体を作成した。即ち、30匹のBalb/c系マウスを5つのグループに分け、以下の物質を週3回、腹腔内投与し免疫した。即ち、グループ1にはFCSのみの200 μl (n=3)を、グループ2には20倍に濃縮したRPMI-1640培地の200 μl (n=5)を、グループ3には血清フリーRPMI-1640培地中に含まれる10⁶個のSK-BR-3細胞(n=6)を、グループ4にはSK-BR-3細胞によって調製された20倍濃縮培地の200 μl (n=11)を、またグループ5にはA-431細胞により調製された20倍濃縮培地の200 μl (n=5)を、それぞれ投与した。第4回目の投与は次のようにして行なった。即ち、グループ1にはFCSのみの200 μlを、グループ2には80倍に濃縮したRPMI-1640培地の200 μlを、グループ3には血清フリーのRPMI-1640培地中に含まれる10⁶個のSK-BR-3細胞を、グループ4にはSK-BR-3細胞によって調製された80倍濃縮培地の200 μlを、またグループ5にはA-431細胞により調製された80倍濃縮培地の200 μlを、それぞれ投与した。3日の後、マウスから得た血清をc-erbB-2遺伝子産物とEGFRに対する抗体の存在の確認を行なうための免疫沈降反応に供した。免疫沈降反応と電気泳動は、実施例1の④の方法に従って、放射性標識したSK-BR-3細胞とA-431細胞からの細胞溶解液又は調整した培地を4℃で3時間の間各10 μlのポリクローナル抗体とモノクローナル抗体又はNMS(正常マウス血清:normal mouse serum)と共にインキュベートした後各種の処理をして免疫沈降を行なった。

【0073】免疫沈降反応の結果を第1図及び第2図に示す。

【0074】第1図中、AはSK-BR-3細胞の分解産物からの、BはA-431細胞の分解産物からの、それぞれの免疫沈降を表わし、レーンaはポリクローナル抗体Ab-1を、レーンbはポリクローナル抗体pAb1を、レーンcはモノクローナル抗体SV2-61rを、レーンdは本発明モノクローナル抗体GFD-OA-p185-1を、レーンeはEGFRに対するモノクローナル抗体RPN513を、またレーンfはNMSを、それぞれ示す。また、図のAにおける黒ぬり三角印は、SK-BR-3細胞分解物からの³²Pで標識したc-erbB-2遺伝子産物の免疫沈降を示し、図のBにおける黒ぬり矢印は、A-431細胞分解物からの³²Pで標識したEGFR遺伝子産物の免疫沈降を示す。各図における数字は分子量マーカーの分子量を表わ

す。

【0075】該図より次のことが判る。

【0076】即ち、SK-BR-3細胞の ^{32}P 標識の結果では、キナーゼドメインとカルボキシ末端を認識するポリクローナル抗体とc-erbB-2遺伝子産物の細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体及び本発明のモノクローナル抗体GFD-OA-p185-1はともに分子量185000をもつc-erbB-2遺伝子産物でリン酸化した蛋白を免疫沈澱した（図のAのレーンa～レーンd参照）。しかし、EGFRの細胞外ドメインを認識する抗EGFR抗体は、NMSと全く同じようにこの蛋白を免疫沈澱させなかった（図のAのレーンe～レーンf参照）。また、A-431細胞の ^{32}P 標識の結果では、c-erbB-2遺伝子産物に一致するリン酸化バンドは、c-erbB-2遺伝子産物に対する抗体では検出されなかった（図のBのレーンa～レーンd参照）。しかし、170000の分子量を持つリン酸化したEGFRは、抗EGFR抗体により免疫沈澱した（図のBのレーンe参照）。

【0077】第2図中、AはSK-BR-3細胞の分解産物からの、BはA-431細胞の分解産物からの、それぞれの免疫沈澱を表わし、レーンaはモノクローナル抗体SV2-61 γ を、レーンbはモノクローナル抗体RPN513を、レーンcはNMSを、レーンdはFCSによって免疫された抗血清を、レーンeは濃縮されたRPMI-1640培地によって免疫された抗血清を、レーンf～レーンhはそれぞれSK-BR-3細胞によって免疫された抗血清を、レーンi～レーンkはそれぞれSK-BR-3細胞によって調製された20倍濃縮培養液により免疫された抗血清を、レーンl～レーンnはそれぞれA-431細胞によって調製された20倍濃縮培養液により免疫された抗血清を表わす。

【0078】また、図のAにおける黒ぬり三角印はSK-BR-3細胞分解物からの ^{32}P で標識したc-erbB-2遺伝子産物の免疫沈澱を示し、図のBにおける黒ぬり矢印はA-431細胞分解物からの ^{32}P で標識したEGFR遺伝子産物の免疫沈澱を示す。また数字は分子量マーカーの分子量を表わす。

【0079】該図より次のことが判る。

【0080】即ち、SK-BR-3細胞の ^{32}P 標識の結果では、NMS、FCSのみ投与したマウスから得られた抗血清、RPMI-1640培地で免疫された抗血清、及びA-431細胞によって調製された濃縮培養液により免疫された抗血清は、共に活性が認められなかった（図のAのレーンc、d、e及びl～n参照）。また、EGFRに対するモノクローナル抗体も同様に活性を示さなかった（図のAのレーンb参照）。SK-BR-3細胞（グループ3）を投与した6匹のマウスから得られた抗血清は、 ^{32}P で標識したSK-BR-3細胞の細胞分解物からの多くのリン酸化蛋白を免疫沈澱させ

た（図のAのレーンf～レーンh参照）。最も強いバンドが分子量185000の分子量サイズであり、 ^{32}P で標識されたc-erbB-2遺伝子として確認された。同様のバンドが抗c-erbB-2遺伝子産物モノクローナル抗体で免疫沈澱された。（図のAのレーンa参照）。SK-BR-3細胞によって調製された濃縮培養液により免疫された（グループ4）11匹のマウスより得られた抗血清は、c-erbB-2遺伝子産物として同定したリン酸化蛋白を特異的に免疫沈澱した（図のAのレーンi～レーンk参照）。また、リン酸化されたA-431細胞の ^{32}P 標識の結果では、A-431細胞によって調製した濃縮培養液で免疫されたマウス（グループ5）から得られた抗血清からのものは、分子量170000を持つバンドを認める抗体を発現させた（図のBのレーンl～レーンn参照）。このバンドはEGFRを認識する抗EGFRモノクローナル抗体と反応したリン酸化EGFRと同じ位置に認められた（図のBのレーンb参照）。また、このグループより得られた血清は、分子量20000を持つバンドをも免疫沈澱させた。このバンドの特徴はまだわかっていない。また、SK-BR-3細胞とSK-BR-3により調整された濃縮培養液で免疫した2つのポリクローナル抗体の170000の分子サイズを持つバンド検出によりc-erbB-2遺伝子がEGFR遺伝子と一部共有する構造を持つことが確認された（図のBのレーンfとレーンi参照）。

【0081】③細胞溶解物と培養液中の蛋白標識と各種抗体との免疫沈澱反応

③-1細胞溶解物の ^{32}P 標識

細胞の標識の前日にSK-BR-3細胞とA-431細胞を 1×10^6 個/35mm皿の密度に播き、リン酸フリーのRPMI-1640培地で3回細胞を洗浄後、37℃で12、24及び48時間の間、5%FCSを含む1mlのリン酸ダルベッコ改変イーグルの培地（pH 7.4）（日本製薬社製）中において ^{32}P i（18.5MBq/ml）でインキュベートした。細胞は4℃で一時間の間、実施例1の③で作成された溶解緩衝液の1mlで可溶化した。培養液（1ml）もまた集めた。細胞溶解液と培養液中の不溶化物を12000×gで10分間遠心分離して除去した。そして細胞溶解液及び培養液の200 μ lを免疫沈澱のために使用材料とした。

【0082】③-2細胞溶解物と培養液中蛋白に対する ^{35}S システイン標識

細胞の標識の前日にSK-BR-3細胞とA-431細胞を 3×10^6 個/60mm皿の密度に播き、細胞をシステインとFCSを含まないメチオニンフリーのRPMI-1640培地で3回洗浄後、同培養液でプレインキュベーションすることにより続けた。そしてそれらを37℃で20及び48時間（SK-BR-3細胞）の間、又は18時間（A-431細胞）の間、1.5mlの1

21

%FCS添加シスチンフリーRPM1-1640培地中に $[^3\text{S}]$ シスチン(3.7MBq/ml:ニューイングランド・ヌクレア社製)と共にインキュベートした。放射性標識した細胞は、4℃で一時間の間、上記3-①と同様の溶解緩衝液の1.5mlで可溶化した。培養液(1.5ml)もまた集めた。細胞溶解液と培養液中の不溶化物を12000×gで10分間遠心分離して除去した。そして細胞溶解液及び培養液の700μlを免疫沈降のために使用材料とした。

【0083】③-3各種抗体との免疫沈降反応

上記③-1及び③-2で作成した放射性標識したSK-BR-3細胞とA-431細胞からの細胞溶解液と培養液を使って、実施例1の④と同様の方法によって免疫沈降を行なった。

【0084】その結果、 ^{32}P で標識したSK-BR-3細胞とA-431細胞の細胞溶解物を使用した結果、 ^{32}P で標識したc-erbB-2遺伝子産物(第1図)と同様に、GFD-OA-p185-1と ^{32}P で標識したEGFRや抗EGFR抗体と全く同じく、細胞外ドメイン、キナーゼドメイン、カルボキシル末端部分を認識する抗c-erbB-2遺伝子産物抗体によって特異的に免疫沈降した。しかし、 ^{32}P で標識したSK-BR-3細胞とA-431細胞によって調整された培養液は、4つの抗c-erbB-2遺伝子産物抗体と1つの抗EGFR抗体で免疫沈降する特異的なバンドは認められなかった。

【0085】次に $[^3\text{S}]$ シスチン標識した細胞溶解物と培養液との各種の抗体との免疫反応の結果を、第3図に示す。

【0086】第3図中、AはSK-BR-3細胞の細胞分解物からの、またBはSK-BR-3細胞の培養液からの、それぞれの免疫沈降を表わし、レーンaはNMSを、レーンbはポリクローナル抗体Ab-1を、レーンcはポリクローナル抗体pAb1を、レーンdはモノクローナル抗体SV2-61γを、レーンeは本発明モノクローナル抗体GFD-OA-p185-1を、それぞれ示す。また、図のAにおける黒ぬり三角印は、SK-BR-3細胞分解物からの $[^3\text{S}]$ シスチンで標識したc-erbB-2遺伝子産物の免疫沈降を示し、図のBにおける白抜き三角印は、SK-BR-3細胞の細胞分解物からの関連した蛋白の免疫沈降を示す。また数字は分子量マーカーの分子量を表わす。

【0087】該図より、 $[^3\text{S}]$ シスチン標識されているSK-BR-3細胞において、4つの異なる抗c-erbB-2遺伝子産物抗体が細胞分解物中の分子量185000のバンドを同定した(図のAのレーンb～レーンe参照)。しかしながら、いくつかの非特異的なバンドがNMSによって検出された(図のAのレーンa参照)。NMSは $[^3\text{S}]$ シスチンで標識したc-erbB-2遺伝子産物であることを示しているバンド

22

を同定しなかった。 $[^3\text{S}]$ シスチン標識SK-BR-3細胞によって調製した培養液を試験したとき、キナーゼドメイン、カルボキシル末端部分を認識するc-erbB-2遺伝子産物に対する2つのポリクローナル抗体は、NMS(図のBのレーンa)と比較したとき、それぞれ如何なる特異的なバンドも見られなかった(図のBのレーンbとレーンc参照)。しかしながら細胞外を認識する抗c-erbB-2遺伝子産物モノクローナル抗体SV2-61γと本発明のモノクローナル抗体GFD-OA-p185-1は、およそ110000の分子量をもつ特異的なバンドを免疫沈降させた(図のBのレーンdとレーンe参照)。この結果はc-erbB-2遺伝子産物関連蛋白質がSK-BR-3細胞によって調製された培養液中にも存在する可能性が考えさせる。

【0088】③-4各種抗体とSK-BR-3細胞とA-431細胞によって調製した培養液中の $[^3\text{S}]$ シスチン標識成長因子レセプター関連蛋白存在下での免疫沈降反応

A-431細胞によって産生したEGFR関連蛋白とこの分子を比較するために、 $[^3\text{S}]$ シスチンで標識したSK-BR-3とA-431細胞を5%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEより分析した。

【0089】その結果を、第4図に示す。

【0090】第4図中、AはSK-BR-3細胞を、またBはA-431細胞によって調製した培養液中の $[^3\text{S}]$ シスチン標識成長因子レセプター関連蛋白質の免疫沈降を、それぞれ示す。各図におけるレーンは以下の免疫沈降の結果を示す。即ち、レーンAのaはNMSと細胞分解物の反応を、レーンAのbは本発明のc-erbB-2遺伝子産物モノクローナル抗体GFD-OA-p185-1と細胞分解物の反応を、レーンAのcはNMSと培養液の反応を、レーンAのdは本発明モノクローナル抗体GFD-OA-p185-1と培養液の反応を、それぞれ示す。またレーンBのaは抗EGFRモノクローナル抗体と細胞分解物の反応を、レーンBのbは抗EGFRモノクローナル抗体との培養液の反応をそれぞれ示す。更に図のAにおける黒ぬり三角印はc-erbB-2遺伝子産物を、白抜き三角印はc-erbB-2遺伝子産物関連蛋白質を示し、図のBにおける黒ぬり矢印はEGFRを、同白ぬき矢印はEGFR関連蛋白質を示す。尚、該図の数字は分子量マーカーの分子量を表わす。

【0091】上記図より、 $[^3\text{S}]$ シスチンとともにSK-BR-3細胞の長時間培養でGFD-OA-p185-1で免疫沈降するバンドは、よりクリアーになった(図のAのレーンd参照)。5%ポリアクリルアミドゲルSDS-PAGEによって、培養中の特異的なバンド分子量の大きさが110000であると計算された。本発明者らは、この分子量が110000の蛋白をp110と命名した。

23

【0092】細胞分解中のc-erbB-2遺伝子のバンドと比較したとき、このバンドの放射性活性は差がなく、p110の一つの大きなものが産生されて培養液中に分泌されていると予想できる。またこの結果は、c-erbB-2遺伝子産物の細胞外ドメインを認識する別の抗c-erbB-2遺伝子産物モノクローナル抗体であるSV2-61 γ を使用したときも同様な結果が得られた。また、分子量が42000をもつバンドが認められ(図のAのレーンd参照)、それはNMSによっても検出された(第3図のAとBのレーンa参照)。本発明者らは、上記バンドの発現量は、長時間のインキュベーションで上昇したけれども、このバンドは非特異的バンドと見なした。A-431細胞による試験結果では、分子量115000のサイズを持つEGFR関連蛋白質が検出された(図のBのレーンb参照)。

【0093】

【実施例4】c-erbB-2遺伝子産物を発現する癌細胞株に対するGFD-OA-p185-1の効果
SK-BR-3細胞株と、A-549細胞株、PC-9細胞株及びLu-65細胞株を用いて、本発明モノクローナル抗体GFD-OA-p185-1の細胞傷害活性の有無を検討した。

【0094】上記A-549細胞株(ヒト肺癌細胞株: ATCC CCL185, [Giard, D. J., et al., J. Nat. Cancer Inst., 51, 1417-1423 (1973)])とPC-9細胞株(ヒト肺癌細胞株: [Kinjo, M., Okada, K., et al., Br. J. Cancer, 39, 15-23 (1979)])は、c-erbB-2遺伝子が発現しており、またLu-65細胞株(ヒト肺癌細胞株: [Yamada, T., et al., Jpn. J. Cancer, Res., 76, 967-996 (1985)])は、同遺伝子の発現のないことが明らかにされている。

【0095】上記4種類の細胞株を5%FCSを含むRPMI-1640培地中の24ウェルプレート中に播いた。SK-BR-3細胞とLu-65細胞は4.5 \times 10⁴個/ウェルの密度に、またA-549細胞とPC-9細胞は1 \times 10⁵個/ウェルの密度になるよう播き付けた。細胞をプレートに付着させた後、モノクローナル抗体GFD-OA-p185-1の100 μ gを最終濃度が100 μ g蛋白/mlとなるように加え、24、48及び72時間の間インキュベートした。ネガティブコントロールとして、モノクローナル抗体の希釈のために使用した緩衝液、或いはモノクローナル抗体の入っていない培養液をコントロールプレートに加えて、同様に24、48及び72時間の間インキュベートした。それぞれの培養の最後に細胞の細胞数をコールターカウンター(機種名: コールター社製)で数えた。細胞数の定量は各3回行なった。

24

【0096】その結果を第5図に示す。該図中、実線(1)は本発明のモノクローナル抗体GFD-OA-p185-1の各種癌細胞株に対する細胞数を、破線(2)はコントロールの細胞数を表わす。また、縦軸は細胞数を示し、横軸は各種癌細胞株と本発明のモノクローナル抗体とのインキュベート時間を示す。

【0097】該図より、本発明のモノクローナル抗体GFD-OA-p185-1は、c-erbB-2遺伝子産物を発現するSK-BR-3細胞とA-549細胞のインビトロでの増殖を有意に抑制した。また、c-erbB-2遺伝子産物を同じく発現するPC-9細胞の成長も本発明のモノクローナル抗体により抑制傾向がみられたが有意ではなかった。しかしながら、c-erbB-2遺伝子産物を発現しないLu-65細胞の成長は本発明のモノクローナル抗体では抑制できなかった。

【0098】上記結果より、c-erbB-2遺伝子産物の細胞外ドメインを認識する本発明モノクローナル抗体GFD-OA-p185-1は、インビトロにおける癌細胞株の増殖に関して抑制効果を示し、腫瘍組織に対する特異的標的細胞傷害活性を増強する能力を有することが明らかである。このことから本発明モノクローナル抗体は悪性腫瘍等の臨床治療剤として有用であることが判る。

【0099】

【実施例5】免疫組織学的検討

本発明のモノクローナル抗体GFD-OA-p185-1のインビトロ特異性の定量のために、乳癌患者から得た腫瘍組織を用いて免疫染色を行なった。

【0100】即ち、乳癌患者(女性)から得た腫瘍組織を10%ホルマリンで固定した後、腫瘍組織のミクロンの部分をパラフィン包埋した後、パラフィン切片を作成した。ABC免疫ペルオキシダーゼ法は、免疫染色を使用した。腫瘍と正常組織のサンプルは本発明のモノクローナル抗体GFD-OA-p185-1の20 μ g蛋白/mlで処理した。また、非特異的抗体結合はモノクローナル抗体の代わりに非免疫血清のサンプルの使用によって調製を行なった。

【0101】その結果を、乳癌患者の腫瘍組織と本発明の抗c-erbB-2遺伝子産物モノクローナル抗体GFD-OA-p185-1との結合反応した結果として、第6図に示す。

【0102】該図より、乳癌腫瘍組織と本発明のモノクローナル抗体の結合性は陽性染色として確認された。

【0103】しかしながら、正常組織は免疫ペルオキシダーゼ試験において本発明のモノクローナル抗体GFD-OA-p185-1に結合しなかった。更に、非免疫血清を使用したとき、腫瘍組織の中から陽性染色細胞は得られなかった。上記のことから本発明モノクローナル抗体は乳癌患者の臨床診断剤として有用であることが判る。

25

【配列表】

【0104】配列番号: 1

配列の長さ: 60

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴:

特徴を表す記号: domain

存在位置: 1-60

特徴を決定した方法: E

配列:

CGCGGCTCCG GGGGGCAAGA GGG
CGAGGAG GAGCCCCCAG CGGCAC
AAGG CCGCCAGCTC 60

【0105】配列番号: 2

配列の長さ: 57

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴:

特徴を表す記号: domain

存在位置: 1-57

特徴を決定した方法: E

配列:

GCCCTGGTAG AGGTGGCGGA GCA
TGTCCAG GTGGGTCTCG GGACTG
GCAG GGAGCCG 57

【0106】配列番号: 3

配列の長さ: 60

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴:

特徴を表す記号: domain

存在位置: 1-60

特徴を決定した方法: E

配列:

GGTGACCAGG GCTGGGCAGT GCA
GCTCACA GATGCCACTG TGGTTG
AAGT GGAGGCAGGC 60

【0107】配列番号: 4

配列の長さ: 66

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

26

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴:

特徴を表す記号: domain

存在位置: 1-66

特徴を決定した方法: E

配列:

GATGAGGATC CCAAAGACCA CCC
CCAAGAC CACGACCAGC AGAATG
CCAA CCACCGCAGA 60GATGAT6

10 6

【0108】配列番号: 5

配列の長さ: 60

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直線状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴:

特徴を表す記号: domain

存在位置: 1-60

20 特徴を決定した方法: E

配列:

TGGAGACCTG GGGGCCTCCT CTT
CAGAGGG CTCCAGCCCT AGTGTC
AGGT CCCCACCGCC 60

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例3の②に従い行なわれた、ポリクローナル抗体と各種抗体との免疫沈降反応の結果を示す図面に代わるSDS-PAGEの写真である。

30 【図2】実施例3の②に従い行なわれた、ポリクローナル抗体と各種抗体との免疫沈降反応の結果を示す図面に代わるSDS-PAGEの写真である。

【図3】実施例3の③-3に従い行なわれた、システイン標識した細胞溶解物と培養液との各種の抗体との免疫反応の結果を示す図面に代わるSDS-PAGEの写真である。

40 【図4】実施例3の③-4に従い行なわれた、各種抗体とSK-BR-3細胞とA-431細胞によって調製した培養液中のシステイン標識成長因子レセプター関連蛋白存在下での免疫沈降反応の結果を示す図面に代わるSDS-PAGEの写真である。

【図5】実施例4に従い行なわれた、c-erbB-2遺伝子産物を発現する癌細胞株に対する本発明抗体の効果を求めたグラフである。

【図6】実施例5に従い、本発明抗体のインビトロ特異性定量的ための免疫組織学的検討を乳癌患者の腫瘍組織の免疫染色によりを行なった結果を示す、生物の形態を示す図面に代わる写真である。